

بررسی اثر عصاره آبی شقایق موکتی *Stichodactyla haddoni* خلیج فارس بر سلول های سرطان سینه انسانی در شرایط آزمایشگاهی

زیبا مقدسی^۱، شهلاجمیلی^{۲*}، دلاور شهباززاده^{۳*}، نریمان مصفا^۴، کامران پوشنگ باقری^{۳*}

*shahbazzadeh@yahoo.com, shahlamjili45@yahoo.com, k_bagheri@pasteur.ac.ir

- ۱- گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران.
- ۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، سازمان تحقیقات و آموزش جهاد کشاورزی، تهران.
- ۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، آزمایشگاه مولکولی درمانی و زهر، انیستیتو پاستور، تهران.
- ۴- گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران.

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۵

چکیده

پروتئینها، پپتیدها و عاملهای شیمیایی موجود در زهر شقایق دریایی، مولکولهای فعال بیولوژیکی با خصوصیات دارویی مفید هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سمیت زهر خام جدا شده از شقایق دریایی *Stichodactyla haddoni* خلیج فارس بر روی سلولهای سرطان سینه انسانی (MD-MBA231) و سلول های طبیعی جنینی کلبه (HEK-293) با آزمون MTT بود. نمونه های *S. haddoni* از جزیره لارک خلیج فارس از جنوب ایران صید شدند. عصاره گیری آبی از تانتاکل ها انجام شد. رده های سلولی در محیط کشت کامل سلولی (RPMI-1640) پاساژ داده شدند. سلولها با غلظتهای مختلف عصاره آبی شقایق دریایی از ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر به صورت رقت سازی متوالی (به نسبت یک دوم) در طی زمان ۲۴ ساعت در معرض قرار گرفتند. آزمون تحلیل واریانس *kruskal-wallis* نشان داد که فعالیت سمیت عصاره روی رده های سلولی مورد مطالعه تقریباً در همه غلظت ها یکسان بودند و تفاوت آماری نداشتند ($p > 0.05$). آزمون ناپارامتری *Mann-whitney* نشان داد میانگین درصد مرگ و میر بین دو گروه سلولهای طبیعی (N) و سرطانی (BC) اختلاف معنی داری وجود دارد ($p \leq 0.001$). IC_{50} عصاره آبی بر روی رده های سلول سرطانی و طبیعی به ترتیب ۴/۱۳ و ۱۱۷/۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می دهد که با افزایش غلظت عصاره، میزان مرگ و میر در هر دو رده سلولی افزایش می یابد. با مقایسه میانگین درصد مرگ و میر غلظتهای مورد آزمایش بین دو رده سلولی، عصاره آبی سمیت سلولی تقریباً ۳/۱۶ برابر را روی سلولهای سرطانی نسبت به سلولهای طبیعی ایجاد کرد. بنابراین، عصاره آبی *S. haddoni* می تواند به عنوان یک عامل مؤثر بازدارندگی رشد رده های سلول سرطانی بخصوص سرطان سینه باشد و حال آن که نسبت به سلول های طبیعی سمیت کمتری دارد.

کلمات کلیدی: *Stichodactyla haddoni*، شقایق دریایی، عصاره خام، فعالیت سمیت سلولی

* نویسنده مسئول

مقدمه

سرطان هنوز یک موضوع نگران کننده سلامتی جامعه درجهان است. مطابق با اطلاعات جمع آوری شده توسط نمایندگی ملی تحقیقات روی سرطان^۱ (IARC) و سازمان سلامت جهانی، ۸/۲ میلیون نفر (۱۳٪) هر سال از سرطان در جهان می میرند. اگر چه شیمیوتراپی هنوز یک راه حل اصلی است، اما به دنبال عوارض کلینیکی زیادی که اتفاق می افتد در نهایت منجر به سمیت آنها می گردد (Aslam et al., 2014).

بنابراین، کشف یا طراحی داروی ضد سرطان کم یا بدون سمیت ضرورت دارد. تعدادی از پروتئینها، پپتیدها و عاملهای شیمیایی در زهر جانوران زهری دریایی، مولکولهای فعال بیولوژیکی قوی ای با خصوصیات دارویی مفید هستند (Cheung et al., 2015). در طی دهه های گذشته، اکثر مطالعات بر روی یافتن داروهای جدید از حیوانات دریایی معطوف شده است (Malve, 2016; Michael & Clinton, 2015). از جمله داروهای مؤثر مشتق شده از جانوران دریایی شامل داروهای ضد سرطان برینتوکسی ماب^۲ (Leal et al., 2014) تراپستیدین^۳ (Rinehart et al., 1990) و دیگر داروها تایید شده که به طور رایج در بازار استفاده می شوند. این موارد، مثالهایی از داروهای دریایی مؤثر هستند. در این نگاه زهر جانوران دریایی، ما را برای پیدایش عامل دارویی مؤثر جدید هدایت خواهد کرد.

اخیرا اثرات هم افزایی اجزاء جدا شده از شقایق دریایی *Bunodeopsis globulifera* جمع آوری شده از مرداب صخره ای در مکزیک روی سلولهای سرطانی آدنوکارسینومای ریه انسان به اثبات رسیده است (Monroy-Estrada et al., 2013). همچنین در مطالعه دیگری اثرات ضد سرطانی زهر شقایق های دریایی *H. magnifica*, *E. quadricolor*, *H. crispa*, *C. adhaesivum* و *H. malu* جمع آوری شده از صخره های مرجانی در استرالیا در برابر سه رده از سلول های سرطانی گزارش شده است (Ramezanpour et al., 2017).

(2012). در مطالعه دیگر نیز نشان دادند که سیتولایزینهای مشتق شده از شقایق های دریایی سمیت القا شده توسط دوزهای پایین داروهای شیمیوتراپی را ۱۰ تا ۳۰۰ برابر افزایش دادند (Soletti et al., 2008).

زهر شقایق دریایی شامل پلی پپتیدهای سیتوتوکسیک می باشند (Anderluh & Macek, 2002). عامل های سیتوتوکسیک ممکن است مرگ سلولی در سلول های سرطانی و طبیعی را القا کنند که به اختلاف در خصوصیات غشاء سلولی آنها مربوط می باشد (Macek et al., 1998; Tejuca et al., 2001). اکثر مطالعات ثابت کرده اند که پپتیدهای سیتولایتیک می توانند تخریب بیشتری بر روی سلولهای سرطانی نسبت به سلول های طبیعی داشته باشند (Tejuca et al., 2009; Pentón et al., 2009).

این پپتیدها، برای درمان سرطان در برابر سلول های آدنوکارسینومای انسان مانند سرطان های سینه، ریه، معده و دیگر سرطانها پیشنهاد می شوند (Fedorov et al., 2010; Jiang et al., 2013; Monroy-Estrada et al., 2013; al., 2003).

در این خصوص یک عامل ضد سرطانی بدون سمیت از جانوران زهری دریایی یا جانوران غیر زهری گزارشی وجود ندارد. برای رسیدن به این هدف اکثر مولکولها بایستی بر روی انواع سلولهای طبیعی و سرطانی به عنوان یک روش غربالگری، خالص سازی و آزمایش شوند. از بین جانوران زهری موجود در خلیج فارس، *Stichodactyla haddoni* یک شقایق زهری است که برای یافتن عاملهای ضد سرطان و با سمیت کمتر یا بدون سمیت انتخاب شد. *S. haddoni* یک جاندار ثابت و ساکن در اقیانوس و متعلق به خانواده Stichodactylidae است. زهر این خانواده می تواند منبعی از ترکیبات فعال دارویی باشد (Chi et al., 2012; Yan et al., 2005; Frazão et al., 1999; et al., 2012; Kem et al., 1999).

گوناگونی در پراکنش جغرافیایی حیوانات زهری مشابه، می تواند به گوناگونی فعالیتهای بیولوژیکی و سمیتی منجر شود. شرایط خاص خلیج فارس به عنوان یک اکوسیستم بسته، یک فرصت مناسب برای مطالعه فعالیتهای بیولوژیکی و سمیتی در حیوانات زهری است.

^۱ International Agency for Research on Cancer

^۲ brentuximab vedotin

^۳ trabectedin

مخلوط به دست آمده در دمای ۴ درجه برای ۲۴ ساعت انکوبه شد. مخلوط در دور ۱۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (Sigma 1-14, Germany) گردید. سوپرناتانت در دستگاه خشک کن انجمادی (Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen Co., Germany) خشک شد. پودر به دست آمده با آب مقطر تزریقی استریل حل گردید. محلول موجود در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد (Bragadeeswaran, 2012 & Thangaraj).

سنجش پروتئین: غلظت پروتئین سم خام به دست آمده به روش بالا توسط روش برادفورد اندازه گیری شد (Bradford, 1976). در این روش، ماده ای به نام کوماسی برلیان بلو G۲۵۰ با پروتئین کمپلکس آبی رنگی تشکیل می دهد که در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب دارد. برای سنجش پروتئین، ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول شاهد برادفورد صفر شد. در مرحله بعد ۲ میکرولیتر از نمونه مورد نظر به ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه و جذب نوری آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

SDS-PAGES: برای تعیین پروفایل پروتئینی عصاره از روش سدیم دو دسیل آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) استفاده شد (Laemmli, 1970). عصاره به مقدار ۴۰ میکروگرم در میکرولیتر داخل ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ تزریق و با رنگ کوماسی بریلینت بلو رنگ آمیزی شد. برای تعیین وزن مولکولی از یک پروتئین مارکر (۸-۲۵۰ کیلو دالتون) استفاده شد.

کشت سلول: سلول سرطانی سینه انسانی (MDA-MB 231) و سلول نرمل جنینی کلیه انسان (HEK-293) از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. رده های سلولی در محیط کشت کامل (Gibco RPMI 1640 Company, USA) با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS Gibco Company, USA) و ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین در فلاسک های کشت سلول پاساژ داده شدند. فلاسک های پاساژ داده شده در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO₂ و ۸۰٪ رطوبت انکوبه شدند.

در خصوص اهمیت تحقیق برای پیدایش عامل های ضد سرطانی، هدف این مطالعه تعیین فعالیت های سمیت سلولی عصاره آبی شقایق دریایی خلیج فارس، *Stichodactyla haddoni* بر روی رده های سلول های سرطانی (MDA-MB 231) و سلول های طبیعی جنینی کلیه انسان (HEK-293) است.

مواد و روش ها

تهیه نمونه: از آب های خلیج فارس ایران و از عمق ۳۰ متری جزیره لارک نمونه های شقایق دریایی صید شدند. نمونه در دمای ۲۰- نگه داری شد و به آزمایشگاه سم شناسی در انیستیتو پاستور ایران انتقال داده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی و ماکروسکوپی تانتاکل های *Stichodactyla haddoni*. A, تصویر ماکروسکوپی. B, تصویر میکروسکوپی تانتاکل ها (B: ۴۰X)

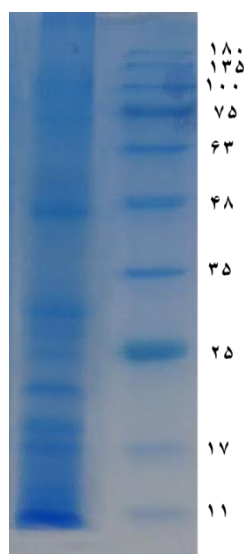
Figure 1: Macroscopic and microscopic image of the tentacles of *Stichodactyla haddoni*. A, Macroscopic image. B, Microscopic image of tentacles (B: 40X).

آماده سازی نمونه: ماده مخاطی ترشح شده بر روی سطح دهانی نمونه ها پاک گردید. توسط یک اسکالپل استریل تانتاکل ها به قطعات کوچک خرد شدند و برای عصاره گیری آماده گردیدند.

عصاره گیری به روش آبی: برای عصاره گیری ۱۴۲ میلی لیتر از آب مقطر دیونیزه به ۳۴/۳۱ گرم از تانتاکل های جدا شده ریخته و با یک همزن مخلوط شدند.

نتایج

سنجش پروتئین: غلظت پروتئین به روش برادفورد با توجه به میزان جذب خوانده شده و با مقایسه آن با نمودار استاندارد برادفورد ۲۱ میکروگرم بر میکرولیتر برآورد شد. **SDS-PAGE:** نتیجه SDS-PAGE عصاره خام مورد مطالعه ۱۲ باند جداگانه نشان داد و ۴ باند واضح با وزن مولکولی پروتئین تقریباً ۱۱، ۱۷، ۲۵ و ۴۸ کیلودالتون مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲: از سمت راست، پروتئین مارکر. پروفایل پروتئینی عصاره آبی زهر *S. haddoni*

Figure 2: From right, Protein marker. Protein profile of aqueous extract of the venom of *S. haddoni*.

ارزیابی فعالیت ضد سرطانی عصاره خام در برابر سلول های سرطانی

آزمون ناپارامتری تحلیل واریانس *kruskal-wallis* نشان داد که درصد مرگ و میر روی ردیف سلول های سرطانی MDA-MB 231 (BC) و سلول های طبیعی-HEK (N) 293 در همه غلظت های عصاره ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ میکروگرم در میلی لیتر فعالیتی مشابه همدیگر داشتند ($p > 0.05$). آزمون ناپارامتری *Mann-whitney* نشان داد میانگین درصد مرگ و میر بین دو گروه سلول های طبیعی (N) و سرطانی (BC) اختلاف معنی داری وجود دارد ($p \leq 0.001$). نتایج به

بررسی میزان سمیت زهر خام بر روی رده های سلولی HEK-293 و MDA-MB 231

در این آزمون از روش MTT و ایجاد کریستال های بنفش رنگ نامحلول فورمازان استفاده شد. مبنای سنجش بر اساس برخورد دادن یا مجاور نمودن رده های سلولی با غلظت های مختلف عصاره و سنجش تعداد سلول های مرده می باشد (Mosmann, 1983). برای کنترل تعداد سلول های انتقال یافته شده به پلیت ها در مرحله نخست از روش تریبان بلو برای سنجش درصد سلول های زنده استفاده گردید. سلول ها به تعداد 1×10^4 سلول به چاهک های پلیت های ۹۶ خانه ای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2) ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل تازه در هر چاهک ریخته شد. سلول ها با غلظت های مختلف عصاره از ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵۶، ۰/۷۸ میکروگرم در میلی لیتر به صورت رقت سازی متوالی (به نسبت یک دوم) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت در طی زمان ۲۴ ساعت معرض قرار گرفتند. چاهک حاوی سلول بدون عصاره به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از به اتمام رسیدن زمان انکوباسیون، محلول رویی سلول ها را دور ریخته و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر MTT ۱٪ (۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات) ریخته و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از برداشتن محلول رویی ۱۰۰ میکرولیتر الکل ایزوپروپانول اضافه گردید. پلیت ها در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی تکان داده شدند. جذب آنها در طول موج ۵۷۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. درصد سلول های مرده با فرمول زیر محاسبه گردید (غضنفری و همکاران، ۱۳۷۴؛ شکرگذار و همکاران، ۱۳۸۶).

$$\text{درصد مرگ} = \left[1 - \left(\frac{\text{میانگین OD تست}}{\text{میانگین OD کنترل}} \right) \times 100 \right]$$

دست آمده از این مطالعه نشان می دهند که با افزایش غلظت عصاره میزان سلول های مرده در هر دو رده سلولی افزایش می یابد (جدول شماره ۱). با مقایسه میانگین درصد مرگ و میر در غلظتهای مختلف مورد آزمایش بین دو رده سلولهای سرطانی و طبیعی ($BC=63/75\%$ ، $N=20/12\%$) نشان داد سمیت روی رده سلولهای سرطانی تقریباً ۳/۱۶ برابر بیشتر از سلولهای نرمال بود. آنالیز رگرسیون خطی ارتباط معنی داری بین فعالیت

سمیت سلولی عصاره روی رده سلولهای BC با رده سلولهای طبیعی N و غلظت های آزمایش شده به ترتیب نشان داد ($R^2_{BC}=0/692$ ، $R^2_N=0/744$). نتیجه IC_{50} غلظت های مختلف عصاره بعد از گذشت ۲۴ ساعت بر روی رده سلولهای BC و N به ترتیب $4/13 \mu g/ml$ و $117/8$ به دست آمد (شکل ۳).

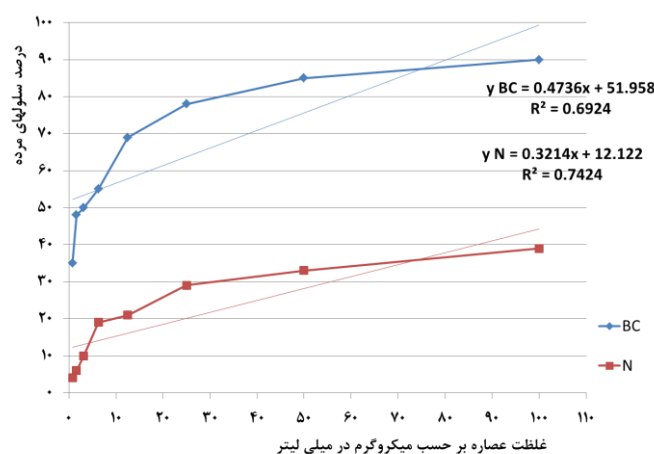
جدول ۱: اثر غلظت های مختلف عصاره آبی *S. haddoni* در زمان ۲۴ ساعت بر روی درصد مرگ و میر رده های سلولی MDA- MB- HEK-293 و 231

Table 1: Effect of various concentrations aqueous extract from *S. haddoni* of the percentage of death rate on cell lines HEK-293 , MDA- MB-231 at 24 h time

غلظت (میکروگرم در میلی لیتر)								
۰/۷۸	۱/۵۶	۳/۱۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰	۱۰۰	
۳۵/۰۳±۲/۰۵	۴۸/۰۳±۰/۸۳	۵۰/۰۶±۰/۳۲	۵۵/۱±۲/۲۷	۶۹/۲±۲/۳۰	۷۸/۰۶±۱/۰۲	۸۵/۰۳±۰/۰۵۱	۹۰/۰۳±۲/۹۱°	BC
۴±۲/۱۷	۶±۳/۰۷	۱۰±۴	۱۹± ۱۰/۴	۲۱±۶/۵۵	۲۹±۵/۸۹	۳۳±۵/۵۶	۳۹±۴/۸	N

* اعداد به صورت Means $\pm$ SD می باشند

“BC”، “N” مخفف های سلول سرطان سینه انسانی و رده سلول طبیعی



شکل ۳: میانگین درصد سلولهای مرده عصاره خام *S. haddoni* در برابر ردیف های سلول MDA- MB-231 ، HEK-293 در مدت ۲۴ ساعت . IC_{50} عصاره خام در برابر ردیف سلول های سرطانی و طبیعی به ترتیب $4/13 \mu g/ml$ و $117/8$. آنالیز رگرسیون خطی ارتباط معنی داری بین فعالیت سمیت سلولی عصاره زهر خام روی رده سلول های BC با رده سلول های N و غلظتهای آزمایش شده نشان داد ($R^2_{BC}=0/692$ ، $R^2_N=0/744$).

Figure 3: The average of percentage dead cells crude extract from *S. haddoni* against cell lines HEK-293 , MDA- MB-231 at 24 h time. IC_{50} of crude venom against cancer and normal cell lines was observed at 4.13, 117.8 μg respectively. Linear regression analysis showed significant correlation between toxicity activity of crude venom on BC cell lines with N cell line and examined doses ($R^2_N=0.744$, $R^2_{BC}=0.692$).

بحث

زهر تولید شده توسط شقایق های دریایی به منظور دفاع و شکارگری می باشد. این سمها می توانند فعالیت دارویی داشته باشند. تحقیق برای کشف داروهای جدید با منشا طبیعی بر روی موجودات دریایی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات زیادی بر روی سمیت سلولی سمهای این موجودات انجام گرفته که فعالیت دارویی موثر در برابر انواع بیماریها، مخصوصا سرطان را تایید می کنند (Mariottini *et al.*, 2014). تحقیق برای داروهای جدید که منجر به پیشرفت سریع داروهای شیمیوتراپی با بازده درمانی بالاتر با اثرات جانبی کمتر، ضرورت پیدا می کند.

در مطالعات وجود پروتئین ها در عصاره متانولی زهر شقایق به روش SDS-PAGE محرز شده است که ساختار شیمیایی این پروتئینها می توانند در درمان بیماریهای مختلف از جمله سرطان مفید باشند (Malve, Cheung *et al.*, 2015; 2016). در تحقیق حاضر نیز باندهای پروتئینی واضحی از زهر خام با وزن مولکولی ۱۱، ۱۷، ۲۵، ۴۸ کیلو دالتون با استفاده از روش SDS-PAGE مشاهده شد. باندهای پروتئینی به دست آمده به روش SDS-PAGE از زهر خام *S. haddoni* آب های ساحلی هند وزن مولکولی ۱۰۳، ۸۲، ۶۳ کیلو دالتون را گزارش کردند (Veeruraj *et al.*, 2007). با مقایسه نتایج ما و مطالعه Veeruraj می توان این تفاوت در پروتئین ها را به خاطر تاثیرات اکولوژی بر پروتئین ها بیان کرد. فعالیت سمی مشابه زهر خام روی ردیف سلول های سرطانی (BC) و سلول های طبیعی (N) مطابق با آنالیز واریانس $p > 0.05$ ، این شباهت قابل ملاحظه نه تنها به ما یک شانس برای پیدایش یک فراکشن با این ویژگی می دهد، بلکه ممکن است یک شانس برای به کار بردن یک عامل ضد سرطان با دوزهای کمتر که مانع از سمیت بر روی سلولهای طبیعی می شود را نیز به ما بدهد. نتایج مقایسه فعالیت سمیت عصاره خام بین سلولهای سرطانی BC و طبیعی، حساسیت متفاوتی را زمانیکه در معرض همان مقدار عصاره خام قرار گرفتند از خود نشان دادند. عصاره خام بر روی سلولهای طبیعی ۳/۱۶ برابر مرگ کمتری را نسبت به سلولهای BC القا کرد. اختلاف معنی دار در سمیت عصاره خام در برابر رده سلولی سرطانی

مورد آزمایش در مقایسه با سلولهای طبیعی ($p < 0.001$) یک پدیده جالب توجه برای وجود یک فراکشن ضد سرطانی بدون سمیت در عصاره خام می تواند باشد. با مقایسه ارتباط معنی داری که بین فعالیت ضد سرطانی عصاره خام روی رده های سلولی BC با سلول های N توسط افزایش دوزهای مورد آزمایش وجود دارد، این مشابهنهت به یک روند وابسته به دوز سمیت روی سلولهای سرطانی و هم روی سلولهای نرمال را اشاره می کند. نتیجه IC_{50} غلظت های مختلف زهر خام بعد از گذشت ۲۴ ساعت بر روی ردیف سلولی های BC و N به ترتیب ($4.13 \mu g/ml$ و $117/8$) به دست آمد. Cline و همکارانش در سال ۱۹۹۵ اثر سمیت سلولی عصاره خام از شقایق دریایی *Urticina piscivora* را بیان کردند و نشان دادند که رشد ۵۰٪ سلول های سرطانی اپیدرموئید دهانی انسان (KB)، سلول های لوکمی (L1210)، سلول های دیپلوئید جنینی ریه انسان (HEL299) به ترتیب در مقادیرهای $6/54 \text{ mg/ml}$ ، $10/07$ ، و $2/34$ مهار کرده بود. آنها اثر ضد سرطانی یک پروتئین طراحی شده UpI جدا شده از شقایق دریایی *Urticina piscivora* را مشخص کردند و نشان دادند که رشد ۵۰٪ از سلول های سرطان اپیدرموئید انسان (KB)، سلول های لوکمیای لنفوسیت موش (L1210)، سلول های دیپلوئید ریه جنینی انسان (HEL299)، به ترتیب در مقادیرهای $40/32$ ، $29/99$ و $29/74 \text{ mg/ml}$ می باشد. آنها بیان کردند که اثر سمیت سلولی عصاره خام و پروتئین طراحی شده UpI بر روی سلولهای طبیعی بیشتر از سلولهای سرطانی مورد مطالعه بوده است (Cline *et al.*, 1995). اما نتایج ما نشان داد سمیت بر روی سلولهای طبیعی نسبت به سلولهای سرطانی مورد مطالعه خیلی کمتر بوده است. پس احتمال پیدا کردن یک عامل ضد سرطانی بدون سمیت در شقایق مورد مطالعه ما وجود دارد. عصاره خام جدا شده از شقایق های دریایی *H. malu*، *C. adhaesivum* و *E. quadricolor* یک اثر مهار کنندگی قابل توجه ای روی سرطان پوست A431 داشت (Ramezanpour *et al.*, 2012). بعلاوه، *H. malu* و *C. adhaesivum* یک اثر مهار کنندگی قابل توجه ای روی رده سلول های سرطان سینه (T47D) به مقدار

سلولهای جنینی موشی NIH سويس (NIH/3T3g) (Jiang et al., 2003) را مهار کرد (۳/۴ μg/ml). Avila و همکارانش (۱۹۸۸) یک سم از شقایق دریایی *Stoichactis helianthus* جدا کردند که سمیت را بر روی سلولهای لوکمیای میلوسیت انسان HL-60 را مهار کرد. عصاره آبی شقایق دریایی *S. haddoni* خلیج فارس می تواند دارای یک عامل ضد سرطانی موثر بر رده سلول های سرطانی به خصوص سرطان سینه و با سمیت کمتر یا بدون سمیت بر روی سلولهای طبیعی انسان باشد.

منابع

شکرگذار، م.ع.، زالی، ح.، رضایی طاویرانی، م. و امان زاده، ا.، ۱۳۸۶. مقایسه دو روش رنگ سنجی MTT و تریبان بلو در تعیین سیتوتوکسیسیته کال پروتکتین بر سلولهای سرطانی معده انسان در شرایط آزمایشگاهی. مجله پزشکی کوثر، ۱۲(۲): ۱۳۷-۱۲۷.

غضنفری، ط.، شاهرخی، س.، ناصری، م.، جلالی ندوشن، م.ر.، یارایی، ر. و کارد، م.، ۱۳۸۵. بررسی سمیت فراورده گیاهی ACA₁ بر روی رده سلول سرطانی ملانوما انسانی. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ۱۶(۵۵): ۴۹-۴۲.

Anderluh, G. and Maček, P., 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria). *Toxicon*, 40: 111-124.

Aslam, M.S., Naveed, S., Ahmed, A., Abbas, Z., Gull, I. and Athar, M. A., 2014. Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients and Evaluation of Patients Opinion about Starvation Based Differential Chemotherapy. *Journal of Cancer Therapy*, 5: 817-822. doi.org/10.4236/jct.2014.58089.

۴۰ μg/mL داشت (Ramezanpour et al., 2012). این نتیجه تقریباً موافق با سمیت عصاره خام *S. haddoni* روی رده سلولی سرطان سینه MDA-MB231 بود. Fedorov و همکارانش در سال ۲۰۱۰ یک پروتئین ضد سرطانی RTX-A از شقایق دریایی *Heteractis crispa* جدا کردند. RTX-A زنده بودن سلول های JB6 P+، THP-1، HELA، Cl41، MDA-MB-231 و snu-c4 انسان را کاهش داد (Fedorov et al., 2010). نتایج ما نیز سمیت عصاره خام *S. haddoni* روی رده سلولی سرطان سینه، MDA-MB231 را نشان داد.

سیتولایزین EqTX-I از شقایق دریایی *Actinia equina* همچنین یک کاهش در زنده بودن سلول های V-79-379 A (دیپلوئید ریه فیروپلاست از هامستر چینی) در یک رفتار وابسته به دوز را القا می کند (Batista et al., 1990). این نتیجه با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. با مقایسه ارتباط معنی دار بین فعالیت سمیت سلولی عصاره خام روی رده سلول های BC و سلول های N توسط افزایش دوزهای مورد آزمایش، این مشابهت، یک روند وابسته به دوز سمیت روی سلول های سرطانی و هم روی سلول های نرمال را اشاره می کند. EqTx-II از *Actinia equina* برای فعالیت سمیت سلولی در برابر رده سلول های گلیوبلاستوما انسان U87 و A172 مطالعه شد. بعد از ۲۴ ساعت از درمان، ۱۰ μg/ml EqTx-II معلوم شد که به طور قابل توجهی سیتوتوکسیک بود و زنده بودن سلولهای U87 و A172 به ترتیب تا ۶۰٪ و ۴۸٪ کاهش داد اما برای سلولهای طبیعی درمقدار ۱۰ μg/ml توکسیک بود و زنده بودن را تا ۸۰٪ کاهش داد (Soletti et al., 2008). نتایج مطالعه ما با نتایج Soletti در سال ۲۰۰۸ نیز مطابقت دارد، سمیت زهر بر روی سلولهای سرطانی بیشتر از سلولهای نرمال بود. در مطالعه Jiang و همکارانش (۲۰۰۳)، یک پروتئین نو ترکیب به نام، Src I از شقایق دریایی *Sagartia rosea* ۵۰٪ فعالیت سیتوتوکسیک را روی رده سلولی های انسانی شامل آستروسیتوما (U251) (۳/۵ μg/ml)، سرطان ریه (NSCLC) (۲/۸ μg/ml)، سرطان کبد (BEL-7402) (۳/۶ μg/ml)، آدنوکارسینوما معده (BGC-823) (۷/۴ μg/ml)،

- Avila, A.D., Mateo de Acosta, C. and Lage, A., 1988.** A new immunotoxin built by linking a hemolytic toxin to a monoclonal antibody specific for immature T lymphocytes. *International Journal Cancer*. 42: 568–571. Doi:10.1002/ijc.2910420417/full
- Batista, U., Macek, P. and Sedmak, B., 1990.** The cytotoxic and cytolytic activity of Equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina*. *Cell Biology International Reports*. 14(11): 1013–1024. DOI: 10.1016/0309-1651(90)90113-D.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cheung, R.C.F., Ng, T.B. and Wong, J.H., 2015.** Marine Peptides: Bioactivities and Applications. *Marine Drugs*. 13: 4006-4043. doi:10.3390/md13074006.
- Chi, V., Pennington, M.W., Norton, R.S., Tarcha, E.J., Londono, L.M., Sims-Fahey, B., Upadhyay, S.K., Lakey, J.T., Iadonato, S., Wulff, H., Beeton, C. and Chandy, K.G., 2012.** Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon*, 59: 529-546. doi:10.1016/j.toxicon.2011.07.016.
- Cline, E.I., Wiebe, L.I., Young, J.D. and Samuel, J., 1995.** Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone *Urticina piscivora*. *Pharmacological Research*. 32: 309–314.
- Fedorov, S., Dyshlovoy, S., Monastyrnaya, M., Shubina, L., Leychenko, E., Kozlovskaya, E., Jin, J.O., Kwaj, J.Y., Bode, A.M., Dong, Z. and Stonick, V., 2010.** The anticancer effects of actinoporin RTX-A from the sea anemone *Heteractis crispa* (=Radianthus macrodactylus). *Toxicon*, 55: 811–817. doi:10.1016/j.toxicon.2009.11.016.
- Frazão, B., Vasconcelos, V. and Antunes, A., 2012.** Sea Anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) Toxins. An Overview. *Marine Drugs*. 10: 1812-1851. doi:10.3390/md10081812.
- Jiang, X., Chen, H., Yang, W., Liu, Y., Liu, W., Wei, J., Tu, H., Xie, X., Wang, L. and Xu, A., 2003.** Functional expression and characterization of an acidic actinoporin from sea anemone *Sagartia rosea*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312: 562–570. doi:10.1016/j.bbrc.2003.10.159.
- Kem, W.R., Pennington, M.W. and Norton, R.S., 1999.** Sea anemone toxins as templates for the design of immunosuppressant drugs. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 15/16(1): 111-29. Doi: 10.1023/A:1017071131670
- Laemmli, U.K., 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. doi:10.1038/227680a0.
- Leal, M., Sapra, P., Hurvitz, S.A., Senter, P., Wahl, A., Schutten, M., Shah, D.K.,**

- Haddish-Berhane, N. and Kabbarah, O., 2014.** Antibody-drug conjugates: An emerging modality for the treatment of cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1231: 41–54. doi: 10.1111/nyas.12499.
- Maček, P., Zecchini, M., Stanek, K. and Menestrina, G., 1997.** Effect of membrane partitioned n-alcohols and fatty acids on pore-forming activity of a sea anemone toxin. *European Biophysics J.* 25(3): 155–162.
- Mariottini, G.L. and Pane, L., 2014.** Cytotoxic and Cytolytic Cnidarian Venoms. A Review on Health Implications and Possible Therapeutic Applications. *Toxins*, 6: 108-151. doi: 10.3390/toxins6010108
- Malve, H., 2016.** Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharmacy Bioallied Sciences*. 8: 83–91. doi: 10.4103/09757406.171700
- Michael, T.D.C. and Clinton, G.L.V., 2015.** Recent Advances in Drug Discovery from South African Marine Invertebrates. *Marine Drugs*. 13: 6366-6383. doi:10.3390/md13106366.
- Monroy-Estrada, H., Chirino, Y., Soria-Mercado, I.E. and Sánchez-Rodríguez, J., 2013.** Toxins from the Caribbean sea anemone *Bunodeopsis globulifera* increase cisplatin-induced cytotoxicity of lung adenocarcinoma cells. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19: 12 doi:10.1186/1678-9199-19-12.
- Mosmann, T., 1983.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1- 2): 55-63. doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Pentón, D., Pérez-Barzaga, V., Díaz, I., Reytor, M.L., Campos, J., Fando, R., Calvo, L., Tejuca, M., Perez-Barzaga, V., Pazos, F., Alvarez, C. and Lanio, M.E., 2009.** Construction of sea anemone cytolyisin-based immunotoxins for selective killing of cancer cells. *Revista Cubana de Física*. 26(1): 15-22.
- Ramezanpour, M., Burke da Silva, K. and Sanderson, B.J.S., 2012.** Differential susceptibilities of human lung, breast and skin cancer cell lines to killing by five sea anemone venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(2): 157-163. Doi:10.1590/S1678-91992012000200005
- Rinehart, K.L, Holt, T.G., Fregeau, N.L., Stroh, G.J., Keifer, P.A., Sun, F., Li, L.H. and Martin, D.G., 1990.** Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Journal of Organic Chemistry*. 55: 4512–4515.
- Soletti, R.C., de Faria, G.P., Vernal, J., Terenzi, H., Anderluh, G., Borges, H.L., Moura-Neto, V. and Gabilan, N.H., 2008.** Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by sea anemone pore-forming proteins in human glioblastoma

cells. *Anti-Cancer Drugs*, 19(5): 517–525.

doi:10.1097/CAD.0b013e3282faa704

Thangaraj, S. and Bragadeeswaran, S.

2012. Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Gulf of Mannar Biosphere Reserve, southeast coast of India. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18(1): 53-61.

doi.org/10.1590/S1678-

91992012000100007

Tejuca, M., Anderluh, G. and Dalla Serra,

M., 2009. Sea anemone cytolsins as toxic components of immunotoxins. *Toxicon*, 54(8): 1206–1214. doi:10.1016/j.toxicon.2009.02.02.

Tejuca, M., Dalla Serra, M., Potrich, C.,

Álvarez, C. and Menestrina, G., 2001. Sizing the radius of the pore formed in

erythrocytes and lipid vesicles by the toxin Sticholysin I from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Journal of Membrane Biology*. 183(2): 125–135. DOI: 10.1007/s00232-001-0060-y

Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar,

T. and Balasubramanian. T., 2007. Isolation and biological properties of neurotoxin from Sea Anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). *Internet Journal of Toxicology*, 5(2). Doi: 10.5487/TR.2016.32.3.215

Yan, L., Herrington, J., Goldberg E.,

Dulski, P.M., Bugianesi, R.M., Slaughter, R.S., Banerjee, P., Brochu, R.M., Priest, B.T., Kaczorowski, G.J., Rudy, B. and Garcia, M.L., 2005. *Stichodactyla helianthus* Peptide, a Pharmacological Tool for Studying Kv3.2 Channels. *Molecular Pharmacology*. 67: 1513–1521. doi.org/10.1124/mol.105.011064.

Studing the effect of aqueous extract of the Persian Gulf carpet anemone (*Stichodactyla haddoni*) on breast cancer cell line in vitro

Moghadasi Z.¹; Jamili S.^{2*}; Shahbazzadeh D.^{3*}; Mosaffa N.⁴; Pooshang Bagheri K.^{3*}

*shahbazzadeh@yahoo.com, shahlajamili45@yahoo.com, k_bagheri@pasteur.ac.ir

1-Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University. Tehran, Iran.

2-Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization

3-Biotechnology Research Center, Medical Biotechnology Department, Venom and Biotherapeutics Molecules Lab, Pasteur Institute of Iran. Tehran, Iran.

4-Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences. Tehran, Iran.

Abstract

Numerous proteins, peptides, and chemical agents in the venom of venomous marine animals are biological active molecules with beneficial pharmacological properties. The main goal of this research was to study the cytotoxic effects of the isolated crude venom from the Persian Gulf sea anemone, *Stichodactyla haddoni* against Breast (MD-MBA231), and Human embryonic kidney (HEK-293) cell lines *in vitro* through using MTT assay. Samples of *S. haddoni* were collected from coastal waters of Lark Island in the Persian Gulf at the south of Iran. Extraction of aqueous part from tentacle was performed. The cell line was cultured in complete tissue culture medium. These cells were exposed to different concentration of venom extract through serial dilution of 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 µg/ml (ratio 1/2) in 24 hour time duration. The results of kruskal-wallis test indicated that the cytotoxic activity of crude venom extract on cell lines were similar in almost all concentrations and significant differences were not observed ($p>0.05$). IC₅₀ of crude venom extract against breast (MD-MBA231) and normal (HEK-293) cell lines was observed at 4.13, 117.8µg/ml, respectively. Results obtained from this study showed that increasing the concentration of extract led to the increasing death of both cell lines. Comparing the percentage of death between two cell lines at different concentrations indicated that aqueous extract induced approximately 3.16 folds more cell toxicity on cancer cell line rather than on normal cell lines. Therefore, crude venom extract of *S. haddoni* can be considered as a strong preventive agent for growth reduction of cancer cell lines especially for breast cancer cell line with low toxicity on normal human cells.

Keywords: *Stichodactyla haddoni*, Crude extract, Cytotoxic activity

*Corresponding author